

イチゴ萎黄病耐病性識別マーカーの共優性化

1. 成果の要約

これまでに、アスカウェイブ由来のイチゴ萎黄病耐病性を識別する DNA マーカーを開発し、実生選抜で利用している。今回、これに更なる改良を加えて耐病性ホモ、ヘテロまたは罹病性ホモを判別できる共優性マーカーを開発した。また、実生選抜では、ポジティブコントロールを加えることで、PCR 増幅の失敗を確実に判別できるように改良した。

2. キーワード

DNA マーカー選抜、共優性マーカー、ポジティブコントロール

3. 試験のねらい

現在、いちご研究所では耐病性遺伝資源の自殖を進めており、今後は萎黄病耐病性遺伝子をホモで持つ中間母本が作出されることが想定される。それらは罹病性品種・系統と交配しても、得られる個体は必ず耐病性であるため、耐病性育種を大幅に加速できる。一方、平成 25 年度からアスカウェイブ由来の萎黄病耐病性を識別する DNA マーカーを用いて耐病性実生個体を選抜しているが、既存のマーカーでは耐病性ホモ、ヘテロまたは罹病性ホモを判別できない。そこで DNA マーカーを改良し、ホモ・ヘテロを判別できる共優性マーカーを開発する。また、実生選抜で用いる簡易検査法では、PCR 増幅の失敗が起きやすいが、それを確実に判別可能な技術に改良する。

4. 試験方法

いちご品種とちおとめ（萎黄病罹病性）及びアスカウェイブ（耐病性）の萎黄病耐病性識別 DNA マーカー周辺の塩基配列を用いて、耐病性ホモ、ヘテロ、罹病性ホモを判別できると予想される図-1 のプライマーを設計した。設計したプライマーの有効性を確認するため、栃木 31 号（耐病性）×栃木素材 2 号（耐病性）F₁ 個体の DNA を供試して PCR を行った。また、同じ個体の葉身を用いてダイレクト PCR を行い、実生選抜で用いる簡易検査法で判別が可能かどうか検討した。

さらに、図-1 のプライマー Fw2 と Rv1 に、いちごで特異的に増幅するポジティブコントロールのプライマー（農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「現場での検査導入を実現する農作物品種 DNA 判定法の開発」で設計）を加え、耐病性系統×罹病性系統 F₁ 個体のダイレクト PCR を行い、罹病性ホモ個体と PCR 増幅失敗の判別が可能かどうか確認した。

5. 試験結果および考察

- (1) 栃木 31 号×栃木素材 2 号 F₁ 個体の DNA を用いて PCR を行った結果、罹病性ホモと推定される系統は最も小さい増幅産物が 1 つ、耐病性ホモと推定される系統はより大きい 2 つの増幅産物、ヘテロでは両方を合わせた 3 つの増幅産物が検出された。この結果から共優性マーカーが開発でき、このマーカーを RFF4 (*Resistance of Fusarium oxysporum f sp. fragariae* 4) とした (図-2)。
- (2) RFF4 をダイレクト PCR により検出を試みた結果、罹病性系統でも耐病性の増幅産物が検出されたため、実生選抜の利用には適さないことが明らかとなった (データ未掲載)。
- (3) プライマー Fw2 と Rv1 にポジティブコントロールのプライマーを加えてダイレクト PCR を行ったところ、罹病性個体と PCR 増幅の失敗について安定して判別が可能であった (図-3)。

(担当者 研究開発部 生物工学研究室 癸生川真也)

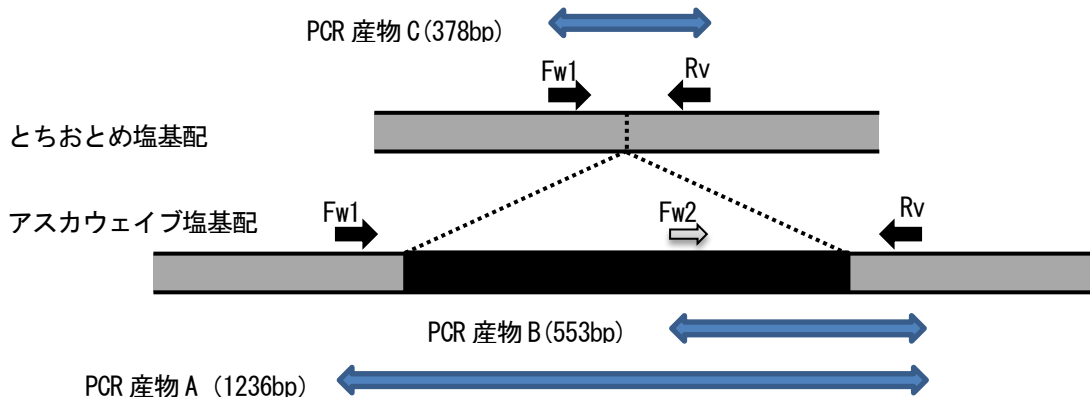


図-1 プライマーの設計場所と増幅する PCR 産物の大きさ

片側矢印の Fw1、Fw2、Rv1 はプライマーの種類を、矢印の方向は伸長反応方向を示す。

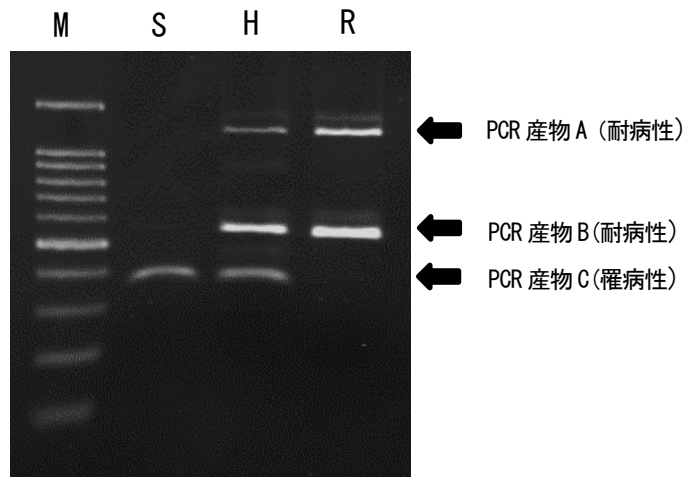


図-2 共優性マーカーの検出例

M : 100bp ラダー S : 罹病性ホモ個体
H : 耐病性・罹病性ヘテロ個体
R : 耐病性ホモ個体

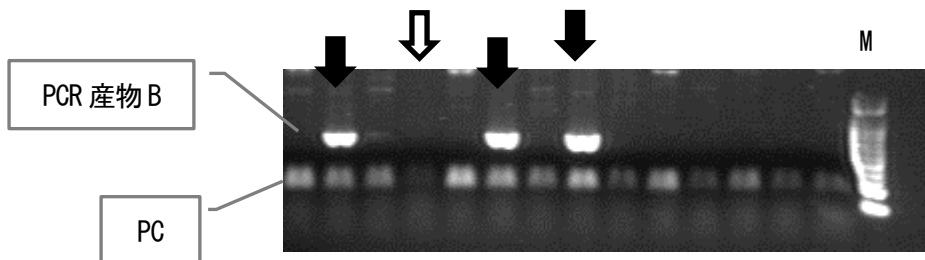


図-3 Fw2, Rv1 に PC を加えたダイレクト PCR によるマーカーの検出例

注 黒矢印 : 耐病性
白矢印 : PCR ミス
矢印無し : 罹病性
M : 100bp ラダー
PC : ポジティブコントロール